

THESIS

MUNICH

1966

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

Untersuchungen mit einem Inhibitionstest
in Verbindung mit dem Latex-Tropfentest
unter Verwendung
von inaktiviertem Vollserum

von

MONIKA/FILIAS

München 1966



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153516_0100

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. W. Seitz

Untersuchungen mit einem Inhibitionstest in Verbindung
mit dem Latex-Tropfentest unter Verwendung von
inaktiviertem Vollserum.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von
Monika Filias
aus
Heidenheim/Brenz
München
1966

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Priv. Doz. Dr. H. Mathies

Coreferent: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Professor Dr. R. Zenker

Tag der mündlichen Prüfung: 22.3.1966

Meinem Vater in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

E i n l e i t u n g	Seite 6
a) Der Rheumafaktor	6
b) Die Inhibitoren der Rheumafaktor-Reaktionen	8
c) Hitzelabile Inhibitoren	10
d) Hitzestabile Inhibitoren	13
E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n	16
a) Methodik	16
Seren und Reagentien	16
Einstellung des Referenzserums	17
Durchführung und Auswertung des Inhibitionstestes	17
Ergebnisse	18
D i s k u s s i o n	22
Z u s a m m e n f a s s u n g	25
L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s	26

E i n l e i t u n g

Der Rheumafaktor

Die Erforschung des Rheumafaktors geht von der Entdeckung MEYER'S (24) aus dem Jahre 1922 aus, daß manche Seren eine agglutinationsfördernde Wirkung auf die Wassermann'sche Reaktion ausüben. Diese Tatsache trat nicht bei nativen, sondern nur bei sensibilisierten Hammelblutkörperchen und menschlichen Erythrocyten auf. Erwärmen auf 53°C beeinflusste den agglutinationsfördernden Faktor nicht, bei 1/2 stündigem Erhitzen auf 70°C wurde er inaktiviert. Die Diagnose zweier untersuchter Fälle war Lebercirrhose und chronische Bronchitis. Erst 1940 brachte WAALER (47) diese Erscheinung in Zusammenhang zur chronischen Polyarthrit. Er fand, daß die spezifische Agglutination von Hammelblutkörperchen durch Anti-Hammelblutkörperchen-Serum bei der Zugabe bestimmter menschlicher Seren gefördert wurde, und zwar soweit, daß die Agglutination noch in Verdünnung auftrat, in denen die alleinige spezifische Agglutination nicht mehr erkennbar war. Im Bezug auf die Häufigkeit der agglutinationsfördernden Wirkung fand der Autor einen Zusammenhang mit der chronischen Polyarthrit, jedoch keinen bezüglich der Blutsenkungsgeschwindigkeit und bezüglich der Blutgruppe. Dieser "agglutination activating factor" wurde durch Erhitzen auf 60°C für 30 Min. nicht beeinflusst. Die spezifischen Agglutinine aus dem Immuns serum wurden durch native Hammelblutkörperchen völlig absorbiert, der agglutinierende Faktor hingegen durch sensibilisierte Hammelblutkörperchen nur unvollständig.

Auf der Beobachtung von ROSE und Mitarbeitern (35), daß Rheuma-Seren auch normale, nicht sensibilisierte Hammelblutkörperchen bis zu einer gewissen Verdünnung agglutinieren können, basiert der Differentialagglutinationstest. Hierbei wurde von ROSE und Mitarbeitern ein Differentialagglutinationstiter als Bewertung zu grunde gelegt, welcher als Quotient des Titters, der mit sensibilisierten Erythrocyten erreicht wird, zu der durch einen heterophilen Anti-

körper gegen Schafserythrocyten bedingten, Agglutination resultiert.

Mit diesem Waaler-Rose-Test begann die serologische Rheuma-Diagnostik. Bei dem abgewandelten Waaler-Rose-Test (Heller-Svartz-Schlossmann-Test) eliminierten HELLER und Mitarbeiter (16), SVARTZ und SCHLOSSMANN (41) die heterophilen Antikörper durch vorherige Absorption an gewaschene Schaferythrocyten und erzielten so statt des Differentialagglutinationstiters die reale Titerhöhe.

Weiterhin stellte sich heraus, daß anstatt der Schaferythrocyten auch solche anderer Tiere (19,33,32,48) oder patienteneigene Erythrocyten (48) nach Sensibilisierung mit spezifischen Kaninchenantikörpern, oder auch menschliche Rh+ Erythrocyten nach Sensibilisierung durch menschliche Rh- Antikörper (14) benutzt werden können. Am geeignetsten hierfür zeigten sich sensibilisierte menschliche Erythrocyten der Gruppe O,Rh Ø , weil hier auf Grund fehlender Agglutinogene, eine vorherige Absorption entfiel (48, 13). Sämtliche bisherige Modifikationen der Haemagglutinationsreaktion hatten gemeinsam, den Rheumafaktor mit Hilfe seiner Fähigkeit, sensibilisierte, d.h. mit Amboceptor beladene Erythrocyten, zu agglutinieren, festzustellen.

Mit Hilfe einer Teilfraktionierung des Serums und somit einer Einengung des Ausgangsmaterials, suchten SVARTZ und SCHLOSSMANN zu besseren Ergebnissen zu gelangen. Durch CO₂-Fraktionierung und Kältepräzipitation konnten sie eine höhere Trefferquote und weniger falsch positive Ergebnisse erzielen (42,44,43). Bei ihrem Euglobulintest benutzten ZIFF und Mitarbeiter (52) eine durch Dialyse gegen Phosphat-Citrat-Puffer gewonnene Euglobulin-Fraktion, während HELLER und Mitarbeiter sowie WINDBLAD (49) durch Zufügen gewisser tierischer und menschlicher Seren den Agglutinationstiter steigern konnten. Dieser SEA-Test (Serum-Erythrocytes-Agglutinationstest) findet mit Zugabe von Schaferythrocyten Anwendung. Eine wesentliche Erkenntnis fand in einer weiteren Modifikation des Haemagglutinationstestes ihren Ausdruck. HELLER und Mitarbeiter (17) entwickelten nämlich ihren F-II-Test von der Tatsache ausgehend, daß Schafery-

throcyten, statt Sensibilisierung mit Amboceptor, auch mit menschlichem γ -Globulin der Cohn-Fraktion-II unspezifisch beladen werden können, wenn sie vorher mit Tannin behandelt wurden. Der Latex-Fixationstest von SINGER und PLOTZ (39), welcher klinische Anwendung findet, benutzt die Tatsache, daß an Stelle von Erythrocyten auch Kunststoffpartikel, wie Latex (39) oder natürliche Kolloide wie Bentonit (2), welche mit γ -Globulin der Cohn-Fraktion II beladen wurden, verwendet werden können. Eine einfachere Variante davon ist der Latex-Tropfentest (29). Dieser geht zurück auf eine von SINGER und PLOTZ beschriebene Objektträgermethode (40). Bei dieser wird dem Serum oder Fingerbeerenblut eine Eosinlösung mit beladenen Latex-Partikeln zugesetzt und die Agglutination auf dem Objektträger beobachtet.

Es wurden also bei allen Nachweismethoden verschiedene Agglutinationssysteme benutzt, wobei als Reaktant γ -Globulin fungierte, spezifisch oder unspezifisch an Partikel gebunden, welche Erythrocyten oder andere Träger sein konnten. Es tritt nun die Frage auf, ob diese Trägersubstanzen nur Indikatoren der Reaktion darstellen. Nach EPSTEIN und Mitarbeitern (11) findet eine Reaktion zwischen Rheumafaktor und γ -Globulin der Cohn-Fraktion II auch dann statt, wenn dieses nicht an einen Träger gebunden ist. γ -Globulin reagiert besser mit Rheumafaktor, wenn es Aggregate bildet, was durch Erhitzen (für 5-30 Min. auf 63-65°C) oder Behandlung mit Harnstoff, Alkali oder Methylmercaptan (10,12,1, 20,28) erreicht wurde. Die Präcipitinreaktion von EPSTEIN (11) benutzt diese Tatsache der Reaktion zwischen Rheumafaktor und nicht an Trägersubstanz gebundenem γ -Globulin. Es wird der Stickstoffgehalt des Präcipitates als Meßgröße der Präcipitation bestimmt. Die zur klinischen Diagnostik angewandte Grenzschichtreaktion von KLEINE und Mitarbeitern (28) beruht auf demselben Prinzip. Es handelt sich hierbei um ein Überschichtungsverfahren, bei welchem an der Grenzschicht zwischen γ -Globulin (erhitzte Cohn-Fraktion II) und dem Rheuma-Serum durch eine Präcipitation bei Lichtdurchfall eine Strahlenablenkung auftritt.

Die Beobachtungen von CECIL und Mitarbeitern (3) aus dem Jahre 1930, nach welchen Rheuma-Serum haemolytische Streptococcen der Gruppe A agglutiniert, fanden nun erst ihre Erklärung. Man hatte zunächst versucht, diese Erscheinung als einen Nachweis spezifischer Antikörper gegen Streptococcen zu erklären und eine pathogenetische Rolle dieser Bakterien für die chronische Polyarthrititis in Erwägung gezogen. Es zeigte sich nun, daß auch andere Bakterien durch Rheuma-Seren agglutiniert wurden (6,31,30). Bei der Zugabe von Serum zu Streptococcen fand LAMONT-HAVERS (21) eine Anlagerung natürlicher Antikörper gegen Streptococcen an diese, wobei jedoch wegen der geringen Konzentration keine Agglutination auftrat. Erst bei Anwesenheit von Rheumafaktor bindet sich dieser an die Antikörper und bewirkt so die Agglutination der Bakterien.

Als Gemeinsames aller Reaktionen ist festzuhalten, daß sich Rheumafaktor an γ -Globulin bindet und eine Präzipitation, bzw. bei Anlagerung des Reaktanten an einen Träger, eine Agglutination bewirkt.

Die Inhibitoren der Rheumafaktor-Reaktionen

Die Erkenntnis, daß das Serum eine, die Agglutination hemmende Wirkung besitzt, brachte neue Möglichkeiten der Erforschung des Rheumafaktor-Nachweises. HELLER und Mitarbeiter stellten 1954 fest (17), daß beim Hinzufügen inaktivierter menschlicher Seren zum Haemagglutinationssystem eine Agglutinationshemmung auftrat. Die Autoren versuchten, eine Erklärung darin zu finden, daß sich die Cohn-Fraktion II in Konkurrenz mit sensibilisierten Hammelblutkörperchen befindet und auf Grund der größeren Affinität der Fraktion II zum Rheumafaktor eine Inhibition auftritt. Nach ZIFF und Mitarbeitern (52) soll sich im Serum von Patienten mit chronischer Polyarthrititis auch ein Inhibitor befinden, weshalb hier der Nachweis des Rheumafaktors mit dem Haemagglutinationssystem nicht gelingt. Um dies zu verhindern, führten sie die Euglobulin-Fraktionierung des Se-

rum durch und benutzten als Ausgangsmaterial für die Haemagglutinationsreaktion die nur agglutinierend wirk-same Euglobulin-Fraktion. Der Überstand wies inhibitori-sche Fähigkeit auf. Hingegen war eine inhibitorische Ak-tivität bei Seren von Nichtrheumatikern sowohl in der Euglobulin-Fraktion als auch im Überstand festzustellen. Auf Grund dieser Erkenntnis wurde der Euglobulin-Test entwickelt, bei welchem durch Verwendung der Euglobulin-Fraktion als Ausgangsmaterial der Haemagglutinations-Re-aktion eine Erhöhung der Trefferquote bezüglich des Rheu-mafaktor-Nachweises erzielt wurde. Ebenfalls von diesen Erkenntnissen ausgehend, werden beim Inhibitionstest (52) verschiedene Verdünnungen der Euglobulin-Fraktion des zu untersuchenden Serums einem Agglutinationssystem aus einer konstanten Verdünnung eines bekannt positiven Rheuma-Se-rums (Referenzserum) und einer Suspension sensibilisierter Schaferythrocyten, beigegeben. Die inhibitorische Potenz des zu untersuchenden Serums wird bestimmt. Diese ist um so geringer, je stärker die Konzentration sein muß, um die Agglutination durch das Referenzserum noch aufheben zu können. Die inhibitorische Wirkung in der Euglobulin-Frak-tion von Rheumatiker-Seren, gewonnen durch Dialyse gegen Phosphat-Citrat-Puffer nach Präzipitation durch kaltes Wasser, war geringer bzw. aufgehoben, wodurch auch in Fäl-len, die im gewöhnlichen Agglutinationstest negativ waren, durch den Nachweis des verminderten Inhibitors im Verhält-nis zur agglutinierenden Aktivität ein positives Tester-gebnis erzielt werden konnte. Die Euglobulin-Fraktionie-rung führten MIEHLKE und PUTNIMS (27) wie ZIEFF und Mitar-beiter (52) durch, indem sie inaktiviertes, von heterophi-len Antikörpern befreites Serum gegen Phosphat-Citrat-Puf-fer dialysierten. Als Reaktant verwendeten sie ebenfalls sensibilisierte Schaferythrocyten. Der Inhibitionstest nach SCHIERZ, der ebenfalls mit einem Haemagglutinations-system durchgeführt wird (36), benutzt ein durch Ammonium-sulfat gefälltes Präcipitat inaktivierter Seren (nach WOLFSSON und Mitarbeitern 50). Bei dieser Modifikation nach

SCHIERZ wird eine geringere Empfindlichkeit, jedoch eine größere Spezifität erzielt, da eine höhere Konzentration und eine andere Bewertungsskala zu Grunde gelegt wurden. HALL und Mitarbeiter (15) haben den Inhibitionstest in Verbindung mit dem Latex-Tropfentest durchgeführt. DEICHER und Mitarbeiter (9) bauten ihre Modifikation auf dem Latex-Fixationstest auf, wobei jedoch statt der Euglobulin-Fraktion eines inaktivierten Serums natives Vollserum als Ausgangsmaterial des zu testenden Blutes benutzt wurde. Sie konnten hierbei die Wirkung eines hitzelabilen Inhibitors, der in der α_2 -Globulinfraction lokalisiert wurde (8), mit erfassen. Sie nahmen ebenfalls Abänderungen der Einstellung des Referenzserums und der Bewertungsskala im Vergleich zu früheren Modifikationen vor.

Hitzelabile Inhibitoren

Das, bei der Ausführung des Latex-Fixationstestes mit positivem Rheuma-Serum in niedriger Verdünnung, häufig auftretende Prozonenphänomen wurde von SCHUBART (37) und SCHUBART und Mitarbeitern (38) auf die Wirkung eines hitzelabilen Inhibitors zurückgeführt.

Es zeigte sich, daß bei einigen Seren, die inaktiviert einen positiven Latex-Fixationstest ergaben, im nativen Zustand sogar eine vollständige Inhibition auftrat. In diesen Fällen war der Latex-Fixationstest mit nativem Serum negativ. Erhitzen für 2 Min. auf 56°C reduzierte die inhibitorische Aktivität, welche bei 15 minütigem Erhitzen vollständig verschwand. SCHUBART fand einen hitzelabilen Inhibitor auch im Normalserum (37), welches dem Rheuma-Serum zugefügt wurde. Eine in mehreren Fällen nach Inaktivierung verbliebene Restinhibition führte zu der Annahme der Existenz eines hitzestabilen Inhibitors.

RANTZ und Mitarbeiter (34) sowie DEICHER (8) versuchten, die Inhibitoren im Eiweißspektrum zu lokalisieren. Bei zonelektrophoretischen Untersuchungen fand DEICHER (8) einen Inhibitor im α_2 -Globulin-Bereich, den RANTZ und Mit-

arbeiter (34) im α - β -Globulin-Bereich lokalisierten. Mit dieser Fraktion wurde im Latex-Hemmungstest eine deutliche Titerreduktion des Referenzserums erzielt.

Der α - $_2$ -Globulin-Inhibitor fand sich bei der Euglobulin-Fraktionierung durch Dialyse gegen Phosphat-Puffer (s.o.) vor Auftrennung der Normalseren im Überstand und in geringerer Menge in der Euglobulin-Fraktion. Die inhibitorische Aktivität der α - $_2$ -Globulin-Fraktion wurde durch 1/2 stündiges Erhitzen auf 56°C völlig aufgehoben. Es dürfte sich hierbei um den von SCHUBART (37) gefundenen hitzelabilen Inhibitor handeln. Seine Aktivität war bei allen Seren konstant (8), gegenüber dem hitzestabilen Inhibitor erwies sich seine Potenz als stärker (34).

Eine Beziehung zum Komplement glaubt SCHUBART (37) auf Grund der Tatsache annehmen zu können, daß Hitzeeinwirkung diesen Inhibitor inaktiviert, und daß mit dem Verlust der inhibitorischen Wirkung gleichzeitig die hämolytische Aktivität der Seren verschwindet. Als weitere Parallellität zum Komplement, und zwar zur hitzelablen Komplement-Komponente C' $_1$ und C' $_2$ konnte SCHUBART nachweisen, daß dieser hitzelabile Inhibitor durch ein Antigen-Antikörpersystem absorbiert wurde, was den Verlust der inhibitorischen Potenz der meisten Seren bewirkte. Weitere Untersuchungen SCHUBART'S (37) brachten genauere Informationen über den Einfluß bestimmter Komplement-Komponenten auf die inhibitorische Wirkung. Durch Lösung mit molar 1:200 monobasischer Kalium-Phosphat-Lösung (nach KABAL und MAYER, zit. 37) erhielt er ein Präcipitat, welches hauptsächlich die Euglobulin-Fraktion und das sogenannte „Komplement-Mittelstück“ enthält, in dem C' $_1$, C' $_3$ und wenig C' $_4$ vorhanden sind, während im Überstand das sogenannte "Endstück" mit C' $_2$, C' $_4$ und wenig C' $_3$ zu finden ist. Der Inhibitor, der durch Erhitzen inaktiviert wurde, fand sich nur im Mittelstück, jener Komplement-Komponente, welche hauptsächlich C' $_1$ und C' $_3$ enthielt. Auch konnte eine Absorption dieses Mittelstückes durch ein Antigen-Antikörper-System festgestellt werden, wodurch der Verlust der inhibitorischen Aktivität eintrat.

Eine Reduktion der inhibitorischen Aktivität durch selektierte Inaktivierung der Komponente C'₃ (mittels Inkubation mit Zymin bei 37°C, nach WHITEHEAD, zit. 37) und der Komponente C'₄ (mit Ammoniak nach KABAL und MAYER, zit. 37) konnte nur in einigen Fällen festgestellt werden. Wenig bekannt ist über die Wirkungsweise des hitzelabilen Inhibitors in den Reaktionssystemen. BERNHARD und Mitarbeiter (1) nehmen an, daß er sich, wie auch Komplement, an beladene Latex-Partikel anlagert.

Nach den Untersuchungen CHRISTIAN'S (4) zeigte es sich, daß unaggregiertes γ -Globulin im Überschuß fähig ist, die Präcipitation zwischen Rheumafaktor und Cohn-Fraktion II zu inhibieren, während in Systemen mit aggregiertem γ -Globulin dieses natürlich selbst zu Reaktant wird und keine Inhibition bewirkt. Demzufolge muß unaggregiertes γ -Globulin in der Präcipitin-Reaktion als hitzelabiler Inhibitor bezeichnet werden. Im Präcipitin-Test zeigt sich die inhibitorische Wirkung darin, daß bei kleinem Reaktionsvolumen das Präcipitat zwischen Rheumafaktor und unerhitzter Cohn-Fraktion II mit ihrem relativ geringen Anteil an γ -Globulin-Aggregaten geringer ist, als bei größerem Reaktionsvolumen (4). CHRISTIAN vermutet, die Inhibition im Präcipitin-Test entspreche der Bildung von 22-S-Komplexen, welche nicht zur Reaktion mit aggregiertem γ -Globulin fähig seien. Das aktive 19-S-Globulin könne jeweils nur eine Reaktion mit 7S- γ -Globulin eingehen, entweder die mit Aggregaten und damit Präcipitation bzw. Agglutination, oder die mit unaggregiertem γ -Globulin und damit Bildung von löslichen 22-S-Komplexen. Für diese Ansicht liegt kein zwingender Beweis vor, obwohl unaggregiertes γ -Globulin im Überschuß die Reaktion zwischen Rheumafaktor und aggregiertem Material in gewissem Ausmaß hindern kann. Möglicherweise besteht hierbei ein Gleichgewicht zwischen der Reaktion mit aggregiertem und der mit nicht aggregiertem γ -Globulin. Nach EPSTEIN (11) werden durch großen Überschuß an γ -Globulin bereits gebildete Präcipitate wieder aufgelöst. Unaggregiertes γ -Globulin ist also unter gewissen Bedingungen als Inhibitor der Rheumafaktor-Reaktion in Betracht

zu ziehen.

Hitzestabile Inhibitoren

Schon 1954 stellten HELLER und Mitarbeiter (17) fest, daß inaktivierte Seren Gesunder die Haemagglutinationsreaktionen des Rheuma-Serums hemmen. Sie glaubten, da die Cohn-Fraktion II die gleiche inhibitorische Wirkung wie das Vollserum zeigt, diesen Inhibitor in dieser Fraktion lokalisieren zu können. Einen hitzestabilen Inhibitor fanden ZIFF und Mitarbeiter (52) sowohl in der Euglobulin-Fraktion als auch in deren Überstand. Bei inaktivierten Rheuma-Seren vermuteten sie die inhibitorische Wirkung nur im Überstand, im Präcipitat hingegen nur agglutinierende Aktivität. Diese Überlegungen führten zur Entwicklung des F-II-Testes und des Inhibitionstestes. Der Inhibitionstest nach ZIFF verwendet die Euglobulin-Fraktion des zu untersuchenden inaktivierten Serums in verschiedenen Verdünnungen. Es wird ein bekannt positives Rheuma-Serum (Referenzserum) in geeigneter Verdünnung beigelegt und die Konzentration bestimmt, in welcher das zu untersuchende Serum im Vergleich zu inhibitionsaktivem inaktivierten Normalserum die Agglutinationswirkung des Referenzserums aufhebt. ZIFF und Mitarbeiter (52) stellten fest, daß bei Rheuma-Seren, welche im üblichen Haemagglutinationstest (F-II-Test) negativ waren, eine höhere Konzentration der Euglobulin-Fraktion notwendig war, um die Agglutinationsaktivität des Referenzserums aufzuheben. Sie schlossen daraus auf eine verminderte Inhibitor-Aktivität dieser an sich rheumafaktornegativen Polyarthritiden-Seren. Ähnliche klinische Ergebnisse fanden später HALL und Mitarbeiter (15) bei der Durchführung des Inhibitionstestes. Im Schafzell-F-II-Inhibitionstest (s.o.) konnte CHRISTIAN (4) zeigen, daß nur aggregiertes γ -Globulin inhibitorisch auf die Agglutination zu wirken vermochte. Unterfraktionen der Cohn-Fraktion II, gewonnen durch Natriumsulfat-Trennung, zeigten nur dann deutliche inhibitorische Aktivität im F-II-Test, wenn sie

aggregiertes Material enthielten. In größerer Menge hatte Cohn-Fraktion II ebenfalls inhibitorische Wirkung, entsprechend ihrem Anteil an unaggregierten Molekülen. EDELMANN und Mitarbeiter stellten fest, daß elektrophoretisch gewonnenes, durch Erhitzen auf 63°C oder Behandlung mit Harnstoff-Merkaptoaethanol, verändertes, menschliches γ -Globulin im Schafzell-Agglutinationstest wie Cohn-Fraktion II die Agglutination von Rheuma-Serum inhibiert. Eine erhebliche Inhibitionswirkung war schon bei "nicht erhitzter" Cohn-Fraktion II festzustellen, welche durch Erhitzen auf 63°C wesentlich verstärkt werden konnte. Nach CHRISTIAN (4) soll der Fraktionierungsvorgang zur Gewinnung der Cohn-Fraktion II eine Inaktivierung des Ausgangsmaterials und Bildung einer Anzahl von Aggregaten bewirken, welche die Inhibition im F-II-Test herbeiführen. Auch FRANKLIN und Mitarbeiter (12) vertreten eine ähnliche Auffassung.

Es konnten somit geringe Rheumafaktormengen nachgewiesen werden, die im üblichen Agglutinationstest noch nicht positiv reagieren. Die Untersuchungen von DEICHER (8) bringen ähnliche Resultate. Er fand bei elektrophoretischer Auftrennung im γ_2 -Globulin-Bereich einen Inhibitor, der nur nach 1/2 stündigem Erhitzen auf 36°C Wirksamkeit zeigte, und zwar im Sinne einer Titerreduktion des Referenzserums. Dieser Inhibitor war auch als Reaktant brauchbar. Einen weiteren Inhibitor vermutete DEICHER (8) im γ_1 - (β_2 -) Globulin-Bereich, der in individuell verschiedener Menge auftritt und eine erheblich verstärkte inhibitorische Aktivität nach Erhitzen des frischen Serums zeigt. Er weist ein ähnliches Verhalten wie aggregierte Cohn-Fraktion II auf und wurde immunelektrophoretisch als 7S- γ -Globulin charakterisiert. Der Autor stellte fest, daß sowohl hitzeaggregierte Cohn-Fraktion II als auch hitzeaggregierter γ -Globulin-Inhibitor als Reaktant ungeeignet war. Er ist daher der Auffassung, den γ_1 -Inhibitor vom Reaktant streng trennen zu können. Im Gegensatz dazu stehen RANTZ und Mitarbeiter (34), die einen, ebenfalls im γ -Globulin-Bereich gefundenen Inhibitor als identisch mit Reaktant

ansehen.

Es handelt sich also in jedem Fall bei dem hitzestabilen Inhibitor um aggregiertes γ -Globulin, welches bei der Aufbereitung der Seren entsteht. Die Tatsache, daß nicht aggregiertes, mit der Ultrazentrifuge gewonnenes γ -Globulin, keinen inhibitorischen Effekt im Schafzell-Agglutinationstest aufweist (10) zeigt, daß es sich bei dem von DEICHER (8) aus Nativ-Serum elektrophoretisch gewonnenen Inhibitor bereits um aggregierte Moleküle handeln muß, was auch DEICHER selbst annimmt. Insofern stellt auch der γ -₁-Globulin-Inhibitor DEICHER'S einen Reaktant dar. DEICHER fand ihn größtenteils in der Euglobulin-Fraktion, geringer im Überstand.

E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n

Bisher wurde der Inhibitionstest in Verbindung mit dem Schafererythrocytentest (5,18,27,36,51,52) und dem Latex-Fixationstest (34,15,7) durchgeführt. Als Ausgangsmaterialien wurden hierbei die Euglobulin-Fraktion oder bestimmte Protein-Fraktionen des zu untersuchenden Serums und Vollserum des Referenzserums verwandt. Mit Hilfe des Inhibitionstestes konnte eine wesentliche Erhöhung der Trefferquote bezüglich des Rheumafaktor-Nachweises bei Patienten mit chronischer Polyarthrititis erzielt werden. Sie wird in der Literatur mit 74,1-99,4 % angegeben (36, 5,26,18,52,27,51,15) gegenüber 48,3-78 % bei Vergleichsuntersuchungen, die ohne Anwendung des Inhibitionstestes durchgeführt wurden (36,27,25,52). Da die Methodik jedoch beträchtliche Schwierigkeiten bereitete, wurde versucht, die Bestimmung unter Anwendung des Latex-Tropfentestes und Vollserum als Ausgangsmaterial vorzunehmen, mit dem Ziel, die Durchführung zu vereinfachen und auch in kleineren Laboratorien möglich zu machen.

Methodik

Seren und Reagentien

I. Referenzserum: hochtitriges rheumafaktor-positives Serum. Dieses wird von einem geeigneten Patienten in größerer Menge abgenommen, in Reagenzgläser in kleine Portionen abgefüllt und bis zum Gebrauch eingefroren. Die einzelnen Portionen sollten so bemessen sein, daß in jedes Röhrchen nicht mehr eingefroren wird, als an einem Tag verbraucht wird, da wiederholtes Auftauen den Titer vermindert. Für eine Untersuchung werden weniger als 0,5 ml benötigt.

II. Zu untersuchendes Serum: Inaktivierung für 30 Min. bei 56°C. Für eine Untersuchung ist weniger als 1 ml erforderlich.

III. Kontrollserum: gepooltes Mischserum oder eine größere Menge eines überprüften, in kleinen Portionen abge-

füllten Serums einer gesunden Versuchsperson.

IV. Latex-Reagens: Suspension von mit γ -Globulin (Cohn-Fraktion II) beladenen Latex-Partikeln. Hier ist es erforderlich, ein Reagens zu benutzen, das von Charge zu möglichst geringe Abweichung hinsichtlich der Titerbestimmung rheumafaktor-positiver Seren aufweist. Am geeignetsten hierfür hat sich das Latex-Reagens der Hyland Laboratories erwiesen (23), wenn auch andererseits eine, gegenüber anderen Präparaten, etwas erhöhte Fehlerquote sogenannter falsch positiver Ergebnisse in Kauf genommen werden mußte.

V. Glycine-Saline-Pufferlösung (Hyland Laboratories).

Einstellung des Referenzserums

Es werden Verdünnungen des Kontrollserums (III) von 1:8 und 1:16 mit Pufferlösung (V) hergestellt. Das Referenzserum (I) wird soweit mit Pufferlösung (V) verdünnt, daß bei Zugabe der Verdünnungen des Kontrollserums zur Verdünnung des Referenzserums zu gleichen Teilen (je 0,25 ml) auf dem Objektträger bei Durchführung des Latex-Tropfentestes eine positive Agglutination mit der Kontrollserum-Verdünnung von 1:16 und keine Agglutination mit der Kontrollserum-Verdünnung von 1:8 sichtbar wird. Die entsprechende Referenzserum-Verdünnung, bei der diese Verhältnisse gegeben sind, ist der Standard für weitere Untersuchungen. Die Verdünnung des Referenzserums muß von Zeit zu Zeit, mindestens aber bei Verwendung einer neuen Latex-Reagens-Charge, kontrolliert oder neu ermittelt werden. Das gleiche gilt erst recht bei Verwendung eines neuen Referenzserums.

Durchführung und Auswertung des Inhibitionstestes.

Von dem zu untersuchenden Serum (II) werden Verdünnungen mit Pufferlösung (V) 1:1 bis 1:16 in geometrischer Reihe hergestellt. Von den verschiedenen Verdünnungen werden je 0,025 ml zu je 0,05 ml der Latexsuspension (IV) auf einen geschwärzten Objektträger gegeben, 0,025 ml der

Standard-Referenzserum-Verdünnung zugefügt und mit einem Glasstab verrührt. Es werden die Ergebnisse der etwaigen Agglutination bei den verschiedenen Proben der unterschiedlichen Verdünnung des zu untersuchenden Serums (bei gleichbleibender Verdünnung des Referenzserums) festgehalten.

Der Inhibitionstest ist positiv, wenn die durch die Referenzserum-Verdünnung (Standard) induzierte Agglutination der mit γ -Globulin beladenen Latex-Partikel durch Verdünnungen des zu untersuchenden Serums von 1:8 und darunter nicht mehr verhindert wird. Er ist negativ, wenn die Verhältnisse so wie bei der Zugabe der Kontrollserum-Verdünnungen vorliegen, das heißt, wenn eine Verdünnung von 1:8 die Agglutination durch die Standardserum-Verdünnung verhindert, eine Verdünnung von 1:16 diese jedoch nicht mehr beeinflusst. Der Auswertung wurde die in Tabelle 1 angegebene Bewertungsskala zu grunde gelegt.

Ergebnisse

Die Seren von insgesamt 90 Patienten mit chronischer Polyarthritiden wurden mit dem Latextropfentest (Reagentien der Hyland Laboratories) und dem Inhibitionstest nach oben angegebener Methodik untersucht. An 54 Seren klinisch gesunder Blutspender wurde die Fehlerquote hinsichtlich sogenannter falsch positiver Ergebnisse festgestellt.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen sind in Tabelle 2 und 3 angegeben. In Tabelle 2 sind die, nach den Röntgenbefunden aufgegliederten, Untergruppen der Fälle mit sicherer und wahrscheinlicher Polyarthritiden gesondert, in Tabelle 3 die sicheren und wahrscheinlichen Polyarthritiden von den fraglichen, nach den Kriterien der American Rheumatism Association getrennt, aufgeführt. Außerdem sind die, bei den Gesunden gefundenen, Ergebnisse in Tabelle 3 angegeben. Die Ergebnisse sind aufgegliedert in diejenigen Fälle, bei denen der Latex-Tropfentest positiv war, und in die, bei denen zusätzlich der Inhibitionstest einfach bis vierfach sicher positiv nach oben angegebener Bewer-

tungsskala ausfiel. Außerdem sind die positiven Inhibitionsteste einschließlich der bei 1:8 nur schwach positiven Ergebnisse aufgeführt.

Tab. 1. Bewertung des Inhibitionstestes

	Verdünnung des zu untersuchenden Serums					Bewertung des Inhibitionstestes
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	
Ausfall der Agglutination im Latextropfentest	∅	∅	∅	∅	+	∅
	∅	∅	∅	(+)	+	(+)
	∅	∅	∅	+	+	+
	∅	∅	+	+	+	++
	∅	+	+	+	+	+++
	+	+	+	+	+	++++

Tab.2. Ausfall des Latextropfentestes und des Inhibitionstestes bei chronischer Polyarthrit, aufgliederung nach dem röntgenologischen Erscheinungsbild

	Fallzahl	Latextropfentest (+) bis +++	Inhibitionstest + bis ++++	Inhibitionstest (+) bis ++++
destruktive chronische Polyarthrit	20	18	19	20
destruktive und appositionelle chronische Polyarthrit	1	1	1	1
appositionelle chronische Polyarthrit	4	3	4	4
destruktive chronische Polyarthrit mit Arthrose	8	2	6	7
appositionelle chronische Polyarthrit mit Arthrose	4	2	3	3
chronische Polyarthrit mit Arthrose	11	9	10	10
chronische Polyarthrit ohne Röntgenveränderungen	23	12	19	20
destruktive und appositionelle chronische Polyarthrit mit Arthrose	1	1	1	1

Tab.3. Ausfall des Latex-Tropfentestes und des Inhibitionstestes bei chronischer Polyarthrits unter Berücksichtigung der diagnostischen Kriterien der ARA

	Fall- zahl	Latextropfen- test (+) bis +++		Inhibitions- test + bis ++++		Inhibitions- test (+) bis ++++	
		n	%	n	%	n	%
sichere und wahrschein- liche chronische Polyarthrits	72	48	66,7	63	87,5	66	91,7
fragliche chronische Polyarthrits	18	5	27,8	10	55,6	13	72,2
chronische Polyarthrits insgesamt	90	53	58,9	73	81,1	79	87,8
Gesunde	54	5	9,3	5	9,3	5	9,3

D i s k u s s i o n

Ein hitzelabiler Inhibitor, der die Reaktion zwischen Rheumafaktor und mit γ -Globulin beladenen Latex-Partikeln hemmt, findet sich sowohl im Normalserum, bei dessen Zugabe zum Agglutinationssystem die Agglutination abgeschwächt wird, als auch im Rheuma-Serum selbst, wie das Frozonenphänomen im Agglutinationstest mit nativem Rheuma-Serum zeigt. Der Inhibitor reagiert im Agglutinationssystem mit Rheumafaktor und mit beladenen Latexpartikeln und blockiert dadurch an den Reaktionsteilnehmern vermutlich Stellen, die eine gegenseitige Reaktion zwischen Rheumafaktor und aggregiertem γ -Globulin ermöglichen. Nach BERNHARD und Mitarbeitern (1) soll er sich dabei hauptsächlich an aggregiertes γ -Globulin anlagern, wogegen DEICHER (8) eine bevorzugte Reaktion mit Rheumafaktor annimmt. Bei elektrophoretischer Trennung wurde er von DEICHER (8) im α_2 -Globulin-Bereich lokalisiert. Die Inaktivierbarkeit bei 56°C, sowie die Möglichkeit der Absorption durch Antigen-Antikörper-Komplexe (52), legte die Annahme der komplement-Natur dieses Inhibitors nahe. Unterstrichen wurde dies durch den Nachweis der inhibitorischen Aktivität der C'₁-Komplement-Komponente (37).

Bei dem sogenannten hitzestabilen Inhibitor handelt es sich um Aggregate von 7S- γ -Globulin, welche beim Erhitzen der Seren entstehen. Durch Aufbereitung der Seren kann auch im nicht inaktivierten Serum ein hitzestabiler Inhibitor auftreten, wobei es sich wahrscheinlich ebenfalls um Aggregate handelt (8). Dieses führt zu der Folgerung, daß ein echter "hitzestabiler" Inhibitor nicht vorliegt, sondern erst durch Aggregatbildung aus 7S- γ -Globulin entsteht. Durch Abstraktion des Rheumafaktors von der Anlagerung an beladene Latex-Partikel wirkt der hitzestabile Inhibitor wie Reaktant.

Die, im ZIFF'SCHEN Inhibitionstest verwendete, aus inaktiviertem Serum stammende, Euglobulin-Fraktion enthält nach CHRISTIAN (4) und FRANKLIN und Mitarbeitern (12) 7S- γ -Globuline im Aggregationszustand, welche mit Rheuma-

faktor im zu untersuchenden Serum reagieren. Die inhibitorische Wirkung des hitzelabilen Inhibitors auf das Referenzserum ist dadurch aufgehoben.

Auf diese indirekte Weise ist das Auffinden geringer Rheumafaktormengen möglich, welche sich im direkten Agglutinationstest dem Nachweis entziehen.

Bei der Inhibition der bereits abgelaufenen Reaktion zwischen Rheumafaktor und beladenen Latex-Partikeln dürfte es sich um die Wirkung von nicht aggregiertem γ -Globulin im Überschuß handeln, wie CHRISTIAN (4) feststellen konnte.

Die hier dargelegte Modifikation des Inhibitionstestes verwendet im Gegensatz zu den bisher durchgeführten Methoden den Latex-Tropfentest und inaktiviertes Vollserum als Ausgangsmaterial. Die Versuchsergebnisse zeigen, daß bei den Seren von Patienten mit sicherer und wahrscheinlicher chronischer Polyarthritiden der Latex-Tropfentest in 66,7 % der Fälle positiv war. Bei Anwendung des Inhibitionstestes in Verbindung mit dem Latex-Tropfentest konnte eine Erhöhung dieser Trefferquote bezüglich des Rheumafaktor-Nachweises auf 87,5 % (bzw. auf 91,7 % bei Berücksichtigung auch der schwach positiven Ergebnisse) erzielt werden. Einen besonderen Wert besitzt der Inhibitionstest in der Diagnostik der fraglichen Polyarthritiden. Von den 72,2 % im gewöhnlichen Latex-Tropfentest rheumafaktornegativen Fällen mit fraglicher chronischer Polyarthritiden konnten noch 38,5 % (bzw. 61,5 %) als serologisch positive Fälle mit Hilfe des Inhibitionstestes ermittelt werden, so daß sich die Trefferquote von 27,8 % auf 55,6 % (bzw. 72,2 %) steigerte. Faßt man die sicheren und wahrscheinlichen mit den fraglichen Polyarthritiden zusammen, so erhöht sich die Trefferzahl von 58,9 % auf 81,1 % (bzw. 87,8 %). Die Quote an falsch positiven Ergebnissen von 9,3 %, welche die Untersuchungen an den Seren gesunder Versuchspersonen mit dem gewöhnlichen Latex-Tropfentest bei Anwendung der genannten Reagentien ergab, erhöhte oder erniedrigte sich nicht bei den Untersuchungen mit dem Inhibitionstest. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden (23), daß die Reagentien der Hyland Laboratories eine höhere Fehler-

quote bei allerdings etwas höherer Trefferquote aufweisen, als die Reagentien des Seruminstitutes Molter und der Behringwerke. Die letztgenannten Reagentien erwiesen sich jedoch wegen der großen Schwankungen zwischen den einzelnen Chargen für die Durchführung des Inhibitionstestes als ungeeignet (23). Auch bei den Reagentien der Hyland Laboratories sind zwischen den Chargen Unterschiede festzustellen, die jedoch geringer sind. Allerdings ist eine Überprüfung oder Neueinstellung der Referenzserum-Verdünnung erforderlich, die sich ohnehin gelegentlich wegen eventueller Titerverluste des Referenzserums empfiehlt. Andererseits sollten sich Titerverluste bei der Aufbewahrung des Referenzserums in gefrorenem Zustand in kleinen Portionen ohne zwischenzeitliches Auftauen weitgehend vermeiden lassen. Die Herstellung von Latex-Reagentien mit unbedingt gleicher Empfindlichkeit und möglichst geringer Fehlerquote, eines geeigneten bereits eingestellten Referenzserums und eines Vergleichsserums würden die Durchführung des Inhibitionstestes wesentlich vereinfachen. Da die, den Latex-Reagentien beigegebenen, negativen und positiven Kontrollseren zur Ausführung des Inhibitionstestes nicht brauchbar sind, würden geeignete handelsübliche Seren die Durchführung der Bestimmung unabhängig von einem Rheumatiker mit hochtitrigem Serum und von gepooltem Mischserum machen, die Neueinstellung des Referenzserums ersparen und höchstens Überprüfungen verlangen. Dies würde eine wesentliche Vereinfachung der Methode bewirken, so daß auch kleinere Laboratorien und die Praxis in der Lage wären, den Inhibitionstest durchzuführen.

Z u s a m m e n f a s s u n g .

Nach einer Einleitung über den Rheumafaktor und die Inhibitoren der Rheumafaktor-Reaktion wird auf die verschiedenen Inhibitionsteste hingewiesen. Die hier aufgeführte Methode benutzt im Gegensatz zu den übrigen den Latex-Tropfentest und inaktiviertes Vollserum als Ausgangsmaterial.

Bei Seren von 90 Patienten mit chronischer Polyarthrititis wurde der Latex-Tropfentest und der Inhibitionstest nach der hier angegebenen Methode durchgeführt. Verglichen mit den Ergebnissen des Latex-Tropfentestes konnte mit dem Inhibitionstest eine Erhöhung der Trefferquote erzielt werden, welche sich bei den Fällen mit fraglicher chronischer Polyarthrititis von besonderem Wert erweist.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. Bernhard, C.G., Cheng, W. and Talmage, D.W.: The reaction of Rheumatoid Factor and Complement with Gamma-Globulin coated Latex.
J.Immunol. 88,750 (1962)
2. Bozicevich, J., Bunim, J.J., Freund, J. and Ward, S.B.: Bentonite flocculation test for rheumatoid arthritis.
Proc. Soc. Exp. Biol. 97,180 (1958)
3. Cecil, R.L., Nicholls, E.E. and Stainsby, W.J.: The etiology of rheumatoid arthritis.
Amer.J.med.Sci. 181,12 (1931)
4. Christian, C.L.: Characterisation of the reactant (gamma-globulin factor) in the F II precipitation reaction and the F II tanned sheep cell agglutination test.
J. exp. Med. 108,139 (1958)
5. Craig, H.W., Kerby, G.P., Persons, E.L.: J.Lab. clin. Med. 49,635 (1957)
6. Dawson, M.H., Olmstead, M. and Boots, R.H.: Agglutination reaction with streptococcus hemolyticus.
J.Immunol. 23,187 (1932)
7. Deicher, H.: Klin. Wschr. 39,612 (1961)
8. Deicher, H. und Behrend, T.: Das γ -Globulin "Antigen" des Latex-Fixationstestes.
Z. Rheumaforsch. 20,119 (1961)
9. Deicher, H., Kirchberg, G., Behrend, T. und Fricke, R.: Mechanismus und Anwendung des Latex-Hemmungstestes zur Diagnostik der primär-chronischen Polyarthritidis.II. Mitteilung.
Klin.Wschr. 40,167 (1962)
10. Edelmann, G.M., Kunkel, H.G. and Franklin, E.C.: Interaction of the rheumatoid factor with antigen-antibody complexes and aggregated gamma-globulin.
J. exp. Med. 108,105 (1958)

11. Epstein, W., Johnson, A. and Raggan, C.: Observations on a precipitation reaction between serum of patients with rheumatoid arthritis and a preparation (Cohn fraction II) of human gamma globulin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 91, 235 (1956)
12. Franklin, E.C., Holman, H.R., Müller-Eberhard, H.J. and Kunkel, H.G.: An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis.
J. exp. Med. 105, 425 (1957)
13. Gibson, H.J. and Ling, N.R.: Modified Waaler-Rose-Reaction employing sensitized human cells.
Ann. Rheum. Dis. 15, 246 (1956)
14. Grubb, R.: Agglutination of erythrocytes coated with "incomplete" anti-Rh by certain rheumatoid arthritic sera and some other sera.
Acta path. microbiol. Scand. 39, 195 (1956)
15. Hall, A.P., Medins, A.D. and Bayles, T.B.: Latex agglutination and inhibition reactions, clinical experience in diagnosis of rheumatoid arthritis.
New England J. Med. 258, 731 (1958)
16. Heller, G., Jacobson, A.S. and Freyberg, R.H.: J. Lab. clin. Invest 57, 16 (1961), zit.: Deicher, H. und Schupp, E.: (24)
17. Heller, G., Jacobson, A.S., Kolodny, M.H. and Kammerer, W.H.: The hemmagglutination test for rheumatoid arthritis II. The influence of human plasma fraction II (gamma globulin) on the reaction.
J. Immunol. 72, 66 (1954)
18. Hess, E.V.: Brit. med. J. 1956 /I, 1426
19. Hobson, D. and Gorill, R.H.: Agglutination test for rheumatoid arthritis. Lancet I , 389 (1952)

20. Kleine, N., Müller, W., und Mathes, M.: Ein neues Verfahren zum Nachweis des Rheumafaktors mittels Streulichtmessung der Grenzschicht zwischen Patientenserum und Gamma-Globulin.
Z. Rheumaforsch. 17, 206 (1958)
21. Lamont-Havers, R.W.: Nature of serum factors causing agglutination of sensitized sheep cells and group. A hemolytic streptococci.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 88, 35 (1955)
22. Laurell, A.B. and Grubb, R.: Complement, complement components, properdin and agglutination promoting factors in rheumatoid arthritis.
Acta path. microbiol. Scand. 43, 310 (1958)
23. Mathies, H.: 7. Internat. Kongr. Inn. Med. München, 5.-8. Sept. 1962.
24. Meyer, K.: Über Haemagglutininvermehrung und Haemagglutination fördernde Wirkung bei menschlichen Seren.
Z. Immunforsch. 34, 229 (1922)
25. Miehle, K., Kruppa, K.H. und Schimanski, J.: Die serologischen Reaktionen zum Nachweis des Rheumafaktors.
Münch. med. Wschr. 102, 382 (1960)
26. Miehle, K. und Schimanski, J.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 65, 386 (1959)
27. Miehle, K. und Puttnins, T.: Der serologische Nachweis des Rheumafaktors durch den Inhibitionstest.
Z. Rheumaforsch. 18, 372 (1959)
28. Müller, W. und Haftstein, F.: Die quantitative Erfassung des Rheumafaktors durch Präzipitation des Serums mit Gamma-Globulin in "Grenzschichtreaktiometer".
Zschr. klin. Med. 156, 154 (1959)

29. Müller, W. und Schupp, E.: Der Latex-Tropfentest (Rheumatoid-Arthritistest) und seine Bedeutung für die Diagnose und Differentialdiagnose chronisch rheumatischer Erkrankungen.
Z. Rheumaforsch. 18, 378 (1959)
30. Oker-Bloom, N.: Serological studies in rheumatoid arthritis, I. A comparison between the agglutination of hemolytic streptococci and certain other bacteria by sera from patients with rheumatoid arthritis.
Ann. med. Exp. Biol. Fenn. 26, 77 (1948)
31. Oker-Bloom, N.: Om agglutination av Staphylococcus vid kroniks polyarthrit.
Nord. Med. 41, 74 (1949)
32. Ouchterlony, O. und Jonsson, E.: Nord. Med. 42, 1449 (1949); zit. Müller-Eberhard, H.J.: (97)
33. Pike, R.M., Sulkin, S.E. and Coggeshall, H.C.: Serological reactions in rheumatoid arthritis. II. Concerning the nature of the factor in rheumatoid arthritis serum responsible for increased agglutination of sensitized sheep erythrocytes.
J. Immun. 63, 447 (1949)
34. Rantz, L.A., Randall, E. and Hettner, D.: Electrophoretic study of serum factors responsible for serological reaction in rheumatoid arthritis with demonstration of two inhibitors.
Arthritis and Rheumatism 2, 104 (1959)
35. Rose, M., Raggan, C., Pearce, E. and Lipman, M.O.: Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 68, 1 (1948)
36. Schierz, G.: Zur serologischen Diagnose der primär chronischen Polyarthrititis mit dem Haemagglutinations-Inhibitionstest.
Z. Rheumaforsch. 21, 162 (1962)

37. Schubart, A.F., Cohen, A.S. and Calkins, E.: Latex-fixation test in rheumatoid arthritis. I. Clinical significance of a thermolabile inhibitor.
New England J. Med. 261,363 (1959)
38. Schubart, A.F.: Latex-fixation test in rheumatoid arthritis II. Characterisation of the thermolabile inhibitor by a serologic study.
New England J. Med. 261,579 (1959)
39. Singer, J.M. and Plotz, C.M.: The Latex-fixation test, I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis.
Amer. J. Med. 21,888 (1956)
40. Singer, J.M. and Plotz, C.M.: Slide latex fixation test. A simple screening method for diagnosis of rheumatoid arthritis.
J. Amer. Med. Ass. 168,180 (1958)
41. Svartz, N. und Schlossmann, K.: En ny serologisk reaktion vid kronisk polyarthrit.
Nord. Med. Tskr. 42,1390 (1949)
42. Svartz, N. and Schlossmann, K.: On substances agglutinating sheep erythrocytes obtained by fractionation of blood serum with carbon dioxide.
Acta med. Scand. 145,216 (1953)
43. Svartz, N. and Schlossmann, K.: Cold precipitable hemagglutinating factor in serum from patients with rheumatoid arthritis.
Ann. rheum. Dis. 14,191 (1955)
44. Svartz, N. and Schlossmann, K.: Agglutination of sensitized sheep erythrocytes by cold precipitable serum substances in rheumatoid arthritis.
Acta med. Scand. 146,313 (1955)
45. Vaughan, J.H.: Behavior of the rheumatoid arthritis agglutinating factor with immun precipitates.
J. Immunol. 77,181 (1956)

46. Vaughan, J.H. and Waller, M.V.: Specificity of the rheumatoid factor. 5. Interim. Scientific Session of the Am. Rheum. Ass., Bethesda, 6. Dez. 1957; zit. Edelmann, G.M. und Mitarbeiter: (28)
47. Waaler, E.: On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles.
Acta path. microbiol. Scand. 17, 172 (1940)
48. Wagner, O.: On the factor producing agglutination of sensitized red cells and its relation to the agglutination of hemolytic streptococci in rheumatoid arthritis serum.
Ann. Med. Exp. Biol. Fenn. 28, Suppl. 8, 1 (1950)
49. Windblad, S.: Studies on agglutination of sensitized sheep cells in rheumatoid diseases. II. On the nature of the agglutinating serum factor.
Acta med. Scand. 142, 458 (1951)
50. Wolfson, W.Q., Cohn, C., Calvary, E. and Ichiba, F.: Am. J. of Clin. Pathol. 18, 732 (1948) zit.: Williams, D. and Fishman, A.: Rose-Waaler-Test using a rapidly prepared serum fraction.
Ann. Rheum. Dis. 17, 383 (1958)
51. Ziff, M.: Genetics, hypersensitivity and the connective tissue diseases.
Amer. J. Med. 30, 1 (1961)
52. Ziff, M., Brown, P., Lo Spalluto, J., Badin, J. and Mc Ewen, C.: Agglutination and inhibition by serum globulin in the sensitized sheep cells agglutination reaction in rheumatoid arthritis.
Am. J. Med. 20, 500 (1956)

Ich danke Herrn Priv. Doz. Dr. H. Mathies für die Überlassung des Themas und Herrn Professor Dr. med. W. Seitz für die Ermöglichung der Untersuchungen in seiner Klinik.

Lebenslauf

Am 16.10.1939 wurde ich, Monika Filias, geborene Fladerer, als 2. Kind des Dr. med. Oswald Fladerer und seiner Ehefrau Ruth, geborene Rösch, in Trautenau (CSR) geboren. 1945 kamen wir nach Heidenheim an der Brenz, wo ich die Volksschule und das Gymnasium besuchte. 1958 bestand ich die Reifeprüfung und begann in Würzburg Medizin zu studieren. Hier legte ich die naturwissenschaftliche und ärztliche Vorprüfung ab. In Graz und München setzte ich mein Studium fort. Nach dem 11. Semester beendete ich das ärztliche Staatsexamen im März 1964 in München.

